大気圧化学イオン化法 LC/MS による食品中遊離アミノ酸の直接分析

アプリケーション

食品

著者

Süreyya Özcan
Food Engineering Department
Hacettepe University
06532 Beytepe, Ankara
Turkey

Hamide Z. Şenyuva
Ankara Test and Analysis Laboratory
Scientific and Technical Research Council of Turkey
Ankara 06330
Turkey

要約

様々なマトリックス中の 22 種類のアミノ酸を、迅速かつ正確に測定および同定できる分析条件を報告します。アミノ酸は酸性に調製した水を使用してマトリックスから抽出しました。液体クロマトグラフィー - マススペクトル (LC/MS) で、22 種類のアミノ酸を誘導体化せずに同時測定を行いました。ナローボアカラムにより、ポジティブイオンモードの LC/大気圧化学イオン化 (APCI) MS で迅速なスクリーニングおよび定量分析が可能になりました。

緒言

官能基 (「R」グループ) により分類された合計 22 種類のアミノ酸があります。22 種類のアミノ酸の中で、8 種類は必須アミノ酸のヒスチジン、リジン、フェニルアラニン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、スレオニンです。ヒトは体を正常に機能させるために食事でこれらを基準量摂取する必要があります。栄養表示のために食品産業にとって、アミノ酸の測定は非常に重要となっています。

プレカラムまたはポストカラム誘導体化技術を利用するアミノ酸分析にはいくつかの方法があります。この手法は良好ですが、分析時間が非常に長いことや、再現性が悪いなどの欠点もあります。アミノ酸分析に使用されるその他のメソッドの大部分は、紫外線吸収または蛍光官能基検出を用いたアミノ酸の誘導体化前後にクロマトグラフ分離を行う必要があります。これらのメソッドは、ニンヒドリンや OPA による誘導体化後の定量が必要で、低い検出下限を示す従来法のイオン交換メソッドよりも速い場合がありますが、これらのメソッドは 20 ～ 75 分とまだ非常に時間を要し、再現性が高くなく、取り組むのが困難です。

この研究の目的は、1) LC/APCI-MS メソッドを改良し、さまざまな食品中の 22 種類のアミノ酸を簡易に、迅速に、正確に、そして再現性よく測定するための分析メソッドを開発すること、2) クリーンナップなしのアミノ酸の簡単な水抽出を開発すること、そして 3) スクリーニングや、定性分析と定量分析の両方を1本のナローボアカラムで短い時間で分析することです。

メソッド

LC 条件

カラム:	ZORBAX Bonus-RP、ナローボア (100 mm x 2.1 mm、3.5 µm)
流量:	0.2 mL/min
移動相:	0.01 mM 酢酸の 0.2% ギ酸水溶液
注入:	1000 µL の中から 20 µL

MS 条件

イオン化モード:	ポジティブ APCI
ネブライザ圧力:	55 psi
乾燥ガス流量:	4 L/min
乾燥ガス温度:	320 ˚C
ベーパライザ温度:	425 ˚C
スキマー:	20 V
キャピラリ電圧:	3 kV
フラグメンタ電圧:	55 V
デュエルタイム:	27 ms

実験

バイナリポンプ、オートサンプラ、温度制御カラムオーブンから構成され、大気圧化学イオン化 (APCI) インタフェースを搭載した Agilent 1100 MS 検出器と組み合わせた Agilent 1100 シリーズ HPLC システムを使用して、LC/MS 実験を行いました。

以下のパラメータを使用して、SIM モードでデータ取込を行いました。乾燥ガス (N_2、100 psig) 流量 4 L.min、ネブライザ圧力 55 psig、乾燥ガス温度 320 ˚C、ベーパライザ温度 425 ˚C、キャピラリ電圧 3 kV、コロナ電流 8 µA、フラグメンタ電圧 55 V、デュエルタイム 27 msec。22 種類の非誘導体化アミノ酸に対してモニタリングされたイオンを表 1 に示します。

0.2% ギ酸水溶液で調製した0.01mM酢酸によるアイソクラティック混合液を使用して、流量 0.2 mL/min、40 ˚Cで、ZORBAX Bonu-RP、ナローボア (100 mm x 2.1 mm、3.5 µm) によりクロマトグラフ分離を実行しました。

サンプル調製

サンプルマトリックスに従って、サンプルを砕くか (メッシュサイズ 2 mm のブレンダーを使用して)、混合 (Ultra Turrax で) しました。ベビーフード、シリアル、クッキーなどの乾燥サンプルは砕き、トマトのような柔らかいサンプルやジュースのような液体サンプルは Ultra Turrax ブレンダーで混合しました。サンプル調製前に、ホモジナイズ済みの各サンプルの pH を測定しました。ホモジネートしたサンプルはプラスチック製スクリューキャップ付き高密度ポリエチレン製ボトルに入れ、–20 ˚Cで保存しました。処理したサンプルを 10 mL のキャップ付きガラス製遠心分離管の中に量り取りました (新鮮重量 [FW])。2 分間ボルテックスミキサーで混合した後、混合物を 5,000 rpm で 10 分間、–5 ˚Cで遠心分離しました。上部に油層がある場合は、それが入らないように、上澄みのみをバイアルに量り移しました。LC/MS 分析の前に、0.45 µm ナイロン製シリンジフィルタで上澄みをろ過しました。

表 1　22 種類のアミノ酸の特異的なフラグメントと定量のため SIM モードで使用されたイオン

ID	フラグメントイオン *m/z*	選択されたイオン *m/z*
アラニン (ala)	90, 73	90
アルギニン (arg)	175, 129	175
アスパラギン (asn)	133, 116, 87, 74	133
アスパラギン酸 (asp)	134, 116, 88	134
システイン (cys)	122, 105, 87, 73	122
シスチン (cys-cys)	241, 122	241
グルタミン酸 (glu)	148, 130, 102	148
グルタミン (gln)	147, 130, 101	147
グリシン (gly)	76, 59	76
ヒスチジン (his)	156, 110, 96, 73, 59	156
ヒドロキシプロリン (hyp)	132, 86	132
ロイシン - イソロイシン (leu-ile)	132, 86	132
リジン (lys)	147, 130, 84	147
メチオニン (met)	150, 133, 104	150
フェニルアラニン (phe)	166, 149, 120	166
プロリン (pro)	116, 70	116
セリン (ser)	106, 88, 60	106
スレオニン (thr)	120, 102, 74	120
チロシン (tyr)	182, 165, 136, 123	182
トリプトファン (trp)	205, 188, 130	188
バリン (val)	118, 72	118

結果と考察

MS フラグメンテーションの最適化とクロマトグラフ条件

フラグメンテーションパターンは再現性が高く、特定の *m/z* フラグメントイオンを測定することにより、定量が可能であると考えられました。55、70、および 100 V でのインソース衝突誘起解離をすべてのアミノ酸に対して検討したところ、最適条件は +55 Vでした。MS パラメータの最適化により、強度が最も高いフラグメンテーションが示されました。その結果、APCI-ポジティブの条件で、SIM-MS は全分析時間 7.5 分以内の優れた同定および定量条件を示しました。

特異性

MS 検出には、溶出した化合物の構造情報が得られるというメリットがあります。さらに、モニタリングの際に異なる *m/z* のイオンを選択することで、共溶出化合物との分離ができます。この研究では、シンプルで迅速かつ

安価なサンプル調製方法を使用しました。0.2 mM 酢酸溶液での抽出すると同時に遠心分離を行い、水溶性コロイド (デンプン) を沈殿させました。食品サンプル中に脂肪が存在する場合は、低温遠心分離で脂肪を分離しました。図 1 には1回の注入で得られた、グリーンピース中の 22 種類のアミノ酸の固有 *m/z* イオンの MS シグナルを示しています。

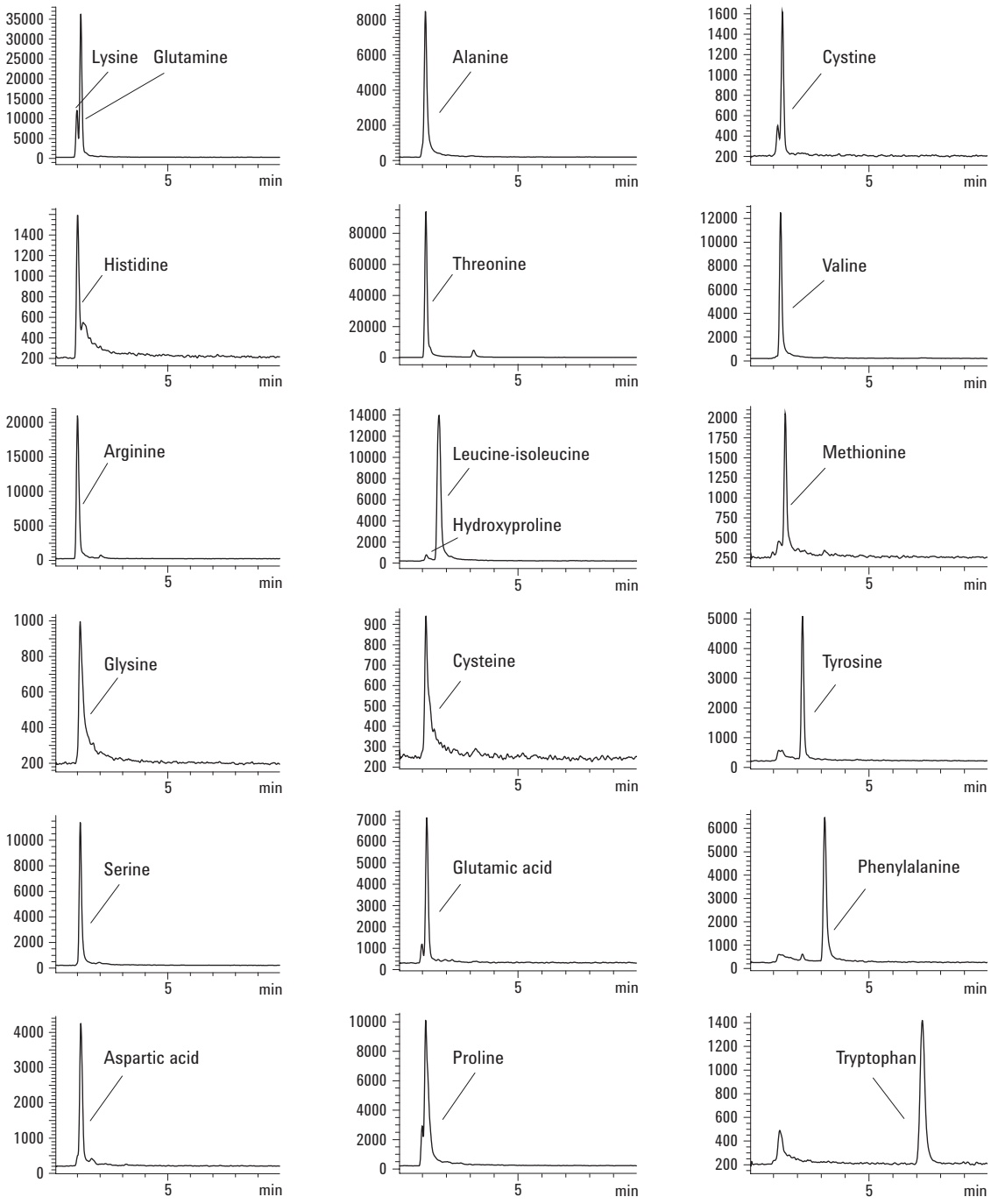

図 1　　LC/APCI-MS を使用した非誘導体化遊離アミノ酸の測定。LC 条件:カラム: ZORBAX Bonus RP (2.1 mm x 100 mm、3.5 µm)、流量: 0.2 mL min^{-1}、移動相組成: 0.01 mM 酢酸の 0.2% ギ酸水溶液、グリーンピース中の 22 種類のアミノ酸特有の *m/z* の MS シグナル。

食品サンプル

この研究では、22 種類のサンプルのアミノ酸含有量を分析しました。食品グループは、ベビーフード、野菜、フルーツ、ジュース、ナッツ、ワイン、ビール、牛乳、鶏肉、蜂蜜です。各食品中のアミノ酸平均濃度は表 2 のとおりです。

表 2　　さまざまな食品中の 22 種類のアミノ酸の結果、mg/100 g FW として

食品タイプ	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Cys-Cys	Glu	Gln	Gly	His	Hyp
ベビーフード	3.59	1.25	1.07	0.50	0.17	9.77	0.37	1.06	0.52	0.30	1.42
トマト	10.07	3.94	11.02	36.86	1.31	1.52	85.94	49.64	2.03	0.34	0.73
グリーンピース	69.84	37.26	112.10	30.22	6.96	3.62	15.78	57.49	7.92	3.27	1.17
西洋ナシ	< LOD	1.81	45.27	17.01	0.60	13.58	8.19	86.33	1.14	< LOD	< LOD
リンゴペースト	< LOD	1.40	3.80	3.56	0.30	16.04	2.18	23.46	< LOD	< LOD	< LOD
リンゴジュース	2.03	1.79	12.80	10.58	0.98	12.52	4.82	39.89	< LOD	0.13	0.43
サワーチェリージュース	1.53	1.62	24.10	7.30	0.38	10.95	7.11	52.45	< LOD	1.01	0.32
オレンジジュース	3.95	8.30	8.08	15.15	0.70	9.99	5.10	3.36	1.38	1.11	0.53
ザクロジュース	15.66	1.99	13.58	17.33	0.27	16.53	17.23	42.35	< LOD	0.17	0.44
ピーチジュース	3.38	1.64	78.57	21.52	0.84	12.26	3.38	10.05	1.44	0.14	0.35
白ブドウジュース	6.54	2.18	10.50	16.08	0.50	16.06	8.34	41.50	1.26	0.11	0.43
赤ブドウジュース	8.58	0.60	5.32	5.54	0.74	17.60	7.98	4.17	1.52	1.46	0.52
ビール	4.00	0.88	2.98	1.15	< LOD	5.33	1.89	1.54	1.48	0.26	8.59
牛乳	7.02	16.50	8.99	4.00	0.36	16.12	9.06	4.85	1.38	0.75	0.36
ワイン	4.49	1.35	0.94	0.55	0.66	0.92	0.73	0.42	1.69	0.46	0.24
蜂蜜	12.23	< LOD	4.16	8.43	< LOD	203.22	7.93	18.90	2.93	1.26	0.76
グリーンコーヒー	41.06	2.38	31.36	70.26	43.19	14.82	57.18	3.89	3.43	3.27	< LOD
ヘーゼルナッツ	12.98	1.28	2.21	13.05	< LOD	6.02	21.01	0.51	2.57	< LOD	< LOD
クルミ	6.56	2.71	0.71	7.42	< LOD	4.90	46.80	3.55	1.72	0.38	0.74
アーモンド	11.39	4.14	57.51	44.92	0.73	4.50	3100	6.31	3.76	0.34	0.46
ピスタチオ	25.15	7.58	14.45	27.40	1.36	5.82	35.64	39.28	2.88	< LOD	7.26

食品タイプ	Leu-ile	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Trp	Val
ベビーフード	0.30	< LOD	0.20	0.26	0.78	0.40	1.66	0.50	0.12	1.21
トマト	0.96	< LOD	0.63	3.25	6.30	3.38	2.70	2.05	0.74	2.43
グリーンピース	26.84	17.41	4.44	13.52	21.50	55.52	0.03	15.45	3.31	38.60
西洋ナシ	1.38	< LOD	< LOD	0.44	17.92	3.86	1.23	0.68	0.48	5.25
リンゴペースト	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.57	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
リンゴジュース	0.32	< LOD	< LOD	< LOD	4.48	0.78	0.33	< LOD	< LOD	1.70
サワーチェリージュース	0.23	< LOD	4.52	0.14	6.52	1.29	0.53	0.25	< LOD	2.62
オレンジジュース	0.37	1.76	4.72	0.99	30.55	6.07	1.13	0.99	0.58	3.64
ザクロジュース	1.37	< LOD	0.53	0.94	8.52	3.01	1.94	1.76	0.64	4.62
ピーチジュース	< LOD	< LOD	< LOD	0.45	12.89	2.48	1.17	0.33	< LOD	2.18
白ブドウジュース	1.54	1.21	0.89	0.81	8.94	2.80	1.75	1.80	0.64	5.10
赤ブドウジュース	1.80	1.39	0.64	1.88	14.05	4.30	5.33	3.90	0.75	5.03
ビール	< LOD	1.17	0.30	0.15	0.84	< LOD	0.32	0.27	< LOD	3.84
牛乳	2.04	1.43	1.80	0.61	11.61	3.14	3.12	2.33	0.65	5.40
ワイン	0.23	1.28	0.25	0.25	30.50	0.36	0.31	2.37	1.86	0.88
蜂蜜	2.06	4.80	< LOD	11.18	81.32	6.31	2.65	8.63	< LOD	6.34
グリーンコーヒー	6.37	4.35	1.66	14.31	32.30	20.48	3.63	13.58	7.66	8.61
ヘーゼルナッツ	3.24	2.06	< LOD	2.41	5.38	3.84	2.38	3.69	2.16	4.08
クルミ	1.81	1.64	0.52	1.09	5.50	1.44	1.12	1.71	1.75	3.01
アーモンド	7.21	4.93	1.93	6.08	33.65	7.82	3.34	4.07	2.28	10.33
ピスタチオ	2.75	3.64	1.43	381	55.98	3.80	3.71	6.00	1.51	5.73

各食品でアミノ酸レベルに大きなバラツキがあります。アミノ酸濃度の違いは、調理方法や加工方法の差による可能性があります。また、タンパク質構成によっても食品の遊離アミノ酸組成にわずかな差を生じる可能性があります。抽出前にサンプルの pH を測定し、ジュース、ビール、ワインは pH 2 ～ 3 の範囲で、トマトは約 pH 4、グリーンピースは pH 6、牛乳は pH 7 でした。アミノ酸の測定は以下のようなさまざまな分野で非常に重要であることが、よく知られています。

1) アミノ酸の濃度比から蜂蜜の原産地を判定。

2) 乳児の生後 1 ヶ月におけるアミノ酸供給量のような栄養分析への応用。充分な検体処理力とデータの質が求められます。

3) アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸などの重要な遊離アミノ酸の測定。これらのアミノ酸は、さまざまな製品中のアクリルアミドの重要な前駆物質となりえます。

結論

この研究では、食品中の 22 種類の遊離アミノ酸を測定するために、信頼性が高く、かつ迅速で簡便な LC/MS メソッドを開発しました。このメソッドは幅広い食品に適用可能なことが分かりました。目標は、ポジティブモードで高い感度を示すアミノ酸を誘導体化せずに、1回のLC/APCI-MS 測定で分析を可能とすることです。さらに酸性の LC/MS 移動相を使用することにより、約 7.5 分という非常に短い分析時間を達成することができました。サンプル調製と分析の両方を合わせ、25 分未満で行えました。従来法では、クリーンナップを伴う長い抽出と誘導体化処理により、5 個のサンプルを分析するのに 1 日を要すると見積もられていました。一方、この新しい分析方法では、同じ時間で 20 サンプルを処理できます。

参考文献

S. Özcan, H. Şenyuva, Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods, *J. Chromatogr. A* (2006), Doi:10.1016/j.chroma.2006.09.039

詳細情報

Agilent 製品およびサービスの詳細は、Agilent のウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。
また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies,Inc. 2006

Printed in Japan
October 27, 2006
5989-5836JAJP

Agilent Technologies